

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-128287

(43)Date of publication of application : 10.05.1994

(51)Int.Cl.

C07K 7/06
C07K 5/10
C12P 21/06
// A61K 37/02
A61K 37/64
A61K 37/64
C07K 99:00

(21)Application number : 04-315515

(71)Applicant : NISSHIN FLOUR MILLING CO LTD

(22)Date of filing : 02.11.1992

(72)Inventor : YOSHIKAWA MASAOKI
FUKUTOME SHINICHI

(30)Priority

Priority number : 03318569

Priority date : 07.11.1991

Priority country : JP

03356633

25.12.1991

04255403

01.09.1992

JP

JP

(54) PEPTIDE AND ITS PRODUCTION

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a peptide, having inhibiting action on angiotensin converting enzymes and useful as hypotensive agent, etc., by hydrolyzing a milk protein with a neutral or an alkaline protease derived from a microorganism and then recovering a fraction having the opioid activity.

CONSTITUTION: A milk protein (e.g. cow's milk β -casein) is incubated and hydrolyzed with a neutral or an alkaline protease (e.g. thermolysin) at 37° C for 5hr and the enzyme is then inactivated by heating at 90° C for 20min. The resultant substance is then centrifuged to remove insoluble substances. The obtained supernatant liquid is subsequently freeze-dried to afford a hydrolyzate, which is then subjected to reversed phase chromatography and eluted with a 0.1% trifluoroacetic acid having 0-40% concentration gradient of an acetonitrile solution concentration to collect a fraction having the opioid activity. Thereby, the objective peptide having an amino acid sequence expressed by formula I or II (Xaa is amino acid) and inhibiting activity against angiotensin converting enzymes is stably obtained in a large amount.

Tyr Pro Phe Pro Gly Pro Ile Xaa Asn

1

5

1

Val Tyr Pro Phe Pro Gly Pro Ile Xaa Asn

1

5

10

11

特開平6-128287

(43) 公開日 平成6年(1994)5月10日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 7/06	Z N A Z	8318-4H		
5/10		8318-4H		
C 1 2 P 21/06		8214-4B		
// A 6 1 K 37/02	A A E	8314-4C		
37/64	A B U			

審査請求 未請求 請求項の数11(全 15 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平4-315515	(71) 出願人	000226998 日清製粉株式会社 東京都中央区日本橋小網町19番12号
(22) 出願日	平成4年(1992)11月2日	(72) 発明者	吉川 正明 京都府城陽市市辺北垣内8番地の1
(31) 優先権主張番号	特願平3-318569	(72) 発明者	福留 真一 東京都杉並区天沼1-33-7-303
(32) 優先日	平3(1991)11月7日	(74) 代理人	弁理士 辻 良子
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		
(31) 優先権主張番号	特願平3-356633		
(32) 優先日	平3(1991)12月25日		
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		
(31) 優先権主張番号	特願平4-255403		
(32) 優先日	平4(1992)9月1日		
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		

(54) 【発明の名称】 ペプチドおよびその製造方法

(57) 【要約】

【構成】 式;Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-Xaa-Asn (式中Xaaはアミノ酸を示す)または式;Val-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-Xaa-Asn(式中Xaaはアミノ酸を示す)で表される新規なペプチド、該新規なペプチド及び塩を有効成分とするオピオイド活性剤及びアンジオテンシン変換酵素阻害活性を有する剤;並びに牛乳β-カゼイン等の乳蛋白を微生物起源の中性プロテアーゼ又はアルカリ性プロテアーゼで加水分解してオピオイド活性及びアンジオテンシン変換酵素阻害活性を有する上記ペプチド類を製造する方法。

【効果】 安価に多量に入手できる牛乳β-カゼイン等の乳蛋白の加水分解により、又は化学合成によって上記ペプチド類を製造することができるので、オピオイド活性及びアンジオテンシン変換酵素阻害活性を有する有用なペプチド類を大量に安定して得ることができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1（式中 Xaa はアミノ酸を示す）で表されるペプチドおよびその塩。

【請求項2】 配列番号2（式中 Xaa はアミノ酸を示す）で表されるペプチドおよびその塩。

【請求項3】 配列番号1（式中 Xaa はアミノ酸を示す）または配列番号2（式中 Xaa はアミノ酸を示す）で表されるペプチドおよびその塩の1種または2種以上を有効成分として含むオピオイド活性を有する剤。

【請求項4】 配列番号1（式中 Xaa はアミノ酸を示す）または配列番号2（式中 Xaa はアミノ酸を示す）で表されるペプチドおよびその塩の1種または2種以上を有効成分として含むアンジオテンシン変換酵素阻害活性を有する剤。

【請求項5】 乳蛋白を微生物起源の中性プロテアーゼまたはアルカリ性プロテアーゼを使用して加水分解し、得られる加水分解物からオピオイド活性を有するペプチドを回収することを特徴とするオピオイドペプチドの製造方法。

【請求項6】 オピオイドペプチドが配列番号3および配列番号4で表されるペプチドである請求項5の製造方法。

【請求項7】 乳蛋白を微生物起源の中性プロテアーゼまたはアルカリ性プロテアーゼを使用して加水分解した後、アミノペプチダーゼを使用して更に加水分解し、得られる加水分解物からオピオイド活性を有するペプチドを回収することを特徴とするオピオイドペプチドの製造方法。

【請求項8】 オピオイドペプチドが配列番号5および配列番号6で表されるペプチドである請求項7の製造方法。

【請求項9】 乳蛋白を微生物起源の中性プロテアーゼまたはアルカリ性プロテアーゼを使用して加水分解した後、アミノペプチダーゼとカルボキシペプチダーゼを同時または順序を問わず逐時に使用して更に加水分解し、得られる加水分解物からオピオイド活性を有するペプチドを回収することを特徴とするオピオイドペプチドの製造方法。

【請求項10】 オピオイドペプチドが配列番号6および配列番号17で表されるペプチドである請求項9の製造方法。

【請求項11】 請求項5～10のいずれか1項の方法により製造された配列番号3～配列番号6および配列番号17で表されるペプチドおよびその塩。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、オピオイド活性とアンジオテンシン変換酵素阻害活性を有するペプチドおよびその塩、その製造方法、並びに当該ペプチドおよびその塩を有効成分として含むオピオイド活性を有する剤およ

びアンジオテンシン変換酵素阻害活性を有する剤に関する。

【0002】

【従来の技術】 食品中には高次の生命活動に関与する多数の生体調節因子が存在することが広く知られるようになっており、それらの生体調節因子を健康の増進、病気の予防や治療、老化の予防等に積極的に利用することが近年色々試みられるようになってきている。そのような生体調節因子としては神経系、消化吸収系、循環系、生体防御・免疫系、内分泌系、細胞分化・増殖系等に作用する種々の因子が知られている。それらのうちで、ある種の食品蛋白質中には神経系に作用してモルヒネ様の麻酔、鎮痛作用等（いわゆるオピオイド活性）を有するペプチド単位が存在していることが明らかになっており、そのようなペプチドはオピオイドペプチドと一般に称されている。

【0003】 乳蛋白、特に牛乳β-カゼインは、そのようなオピオイドペプチドを派生する食品蛋白質の一つである。この蛋白質を起源とするオピオイドペプチドとしては、配列番号17で表されるβ-casomorphin 7 [Brantl et al., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 360, 1211 (1979)], 配列番号18で表されるβ-casomorphin 5 [Henshen et al., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 360, 1217 (1979)], 配列番号19で表されるβ-casomorphin 4 [Brantl et al., Life Sci., 28, 1903 (1981)] 等が挙げられる。

【0004】 これらの牛乳蛋白から派生するオピオイドペプチドは、市販のカゼインペプトン（牛乳を塩酸により加水分解したものまたは牛乳をトリプシン、ペプシン、パンクレアチンからなる複合酵素で加水分解したもの）から単離され、構造決定された。しかしながら、これらのペプチドがカゼインペプトンに含有される量は非常に微量であり、上記したBrantl et al., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 360, 1211 (1979) には、カゼインペプトンからの収率が約0.005%、β-カゼイン（カゼイン含量30%として）からの収率が約0.018%であると記載されている。そのため、実際は市販のカゼインペプトンからそれらのペプチドを単離してオピオイドペプチド活性を有する剤として利用することは不可能であった。また、牛乳β-カゼインから大量にオピオイドペプチドを得ようとする試みも色々なされてきたが、未だ効果的な製造方法は報告されていない。

【0005】 また、血圧上昇をもたらす代表的な生体内因子としてレニン・アンジオテンシン系が、また血圧降下に働く代表的な生体内因子としてカリクレイン・キニン系が知られているが、アンジオテンシン変換酵素（以後「ACE」という）はこのいずれの系にも大きく関与している。その機構を簡単に説明すると、まずレニン・アンジオテンシン系では、血中に分泌された腎臓の酵素レニンが血中のアンジオテンシノーゲンに作用してデカ

3

ペプチドであるアンジオテンシンIを生成する。このアンジオテンシンIは血圧上昇作用を示さないが、これにACEが作用するとオクタペプチドであるアンジオテンシンIIを生成する。このアンジオテンシンIIは末梢血管を収縮させるとともに、副腎皮質に作用してアルドステロンの産出を促し、アルドステロンは腎臓に作用してナトリウムの再吸収・体液量増加を招いて心拍出量の増大をもたらす、そのいずれもが血圧を大きく上昇させる。

【0006】一方、カリクレイン・キニン系では血中の前駆体蛋白質であるキノーゲンに血中酵素のカリクレインが作用してキニンを遊離産出するが、このキニンは末梢血管を拡張させるとともにホスホリパーゼA₂を活性化してプロスタグランジンの合成を促進して血圧を低下させる。ところがこのカリクレイン・キニン系にACEが働くと、ACEは末梢血管の拡張作用およびホスホリパーゼA₂の活性化作用を有する上記キニンを分解・不活性化してしまうために、血圧の降下が生じなくなる。

【0007】したがって、ACEの上記のような働きを阻害する物質（ACE阻害剤）が存在すると、血圧上昇物質であるアンジオテンシンIIの生成が抑制され、且つ血圧降下物質として働くキニンの分解が防止されて、血圧の上昇抑制および血圧降下が可能になる。かかる点から、近年、天然蛋白質から得られたACE阻害作用を有するペプチドに関する研究が色々行われており、そのようなペプチドがACE阻害活性を有する剤として利用し得ることが期待されている。

【0008】

【発明の内容】上記のような状況下に本発明者らは乳蛋白からオビオイド活性を有するペプチドを高収率で得るべく研究を進めてきた。その結果、乳蛋白を微生物由来のプロテアーゼを使用して得た加水分解物に強いオビオイド活性が存在することを見出し、更にこのペプチド混合物を高速液体クロマトグラフィーを用いた逆相クロマトグラフィーで分画すると、そのうちの特定の画分がオビオイド活性を有するペプチドであることを確認した。

【0009】特に、乳蛋白のうちでも牛乳中に多量に含まれている牛乳β-カゼインを微生物起源の中性プロテアーゼまたは微生物起源のアルカリ性プロテアーゼを使用して加水分解を行ってペプチド混合物を形成させ、そこから得られたオビオイド活性を有する画分を単離・精製して、その構造決定をしたところ、配列番号3で表される10個のアミノ酸の配列した新規なペプチドおよび配列番号4で示される10個のアミノ酸の配列した新規なペプチドであることを見出した。

【0010】そして、上記で得た新規な2種類のペプチドまたは該ペプチドを含有する混合物をアミノペプチダーゼを使用して更に加水分解すると、配列番号3のペプチドからは配列番号5で表される新規なペプチドが、また配列番号4のペプチドからは配列番号6で表される新

4

規なペプチドが得られ、配列番号5および配列番号6で表されるそれらのペプチドが一層強力なオビオイド活性を有することを見いだした。

【0011】また、上記で得た配列番号3および配列番号4で表されるペプチドまたは該ペプチドを含有する混合物を、アミノペプチダーゼおよびカルボキシペプチダーゼを使用して、同時にまたは順序を問わず逐時に加水分解すると、配列番号6および配列番号17で示されるペプチドが得られることを見いだした。

10 【0012】そして、本発明者らは、上記で得られた配列番号3、配列番号4、配列番号5および配列番号6で示される新規なペプチドについて、そのACE阻害活性を調べたところ、それら4種のペプチドはオビオイド活性だけでなく、ACEの活性を阻害する作用をも有していることを見いだした。

【0013】乳蛋白、そのうちでも特に牛乳カゼインは容易に且つ多量に入手可能な蛋白質であり、乳蛋白を原料として用いている本発明者らの見いだした上記方法によるときは、オビオイド活性およびACE阻害活性を有するペプチドを、多量に且つ容易に得ることができる。

20 【0014】更に本発明者らは、牛乳β-カゼインから得られた上記の配列番号5または配列番号6で表されるノナペプチドにおいて、そのC末端アミノ酸から2残基目のヒスチジン(His)またはプロリン(Pro)を、アラニン(Ala)、アルギニン(Arg)、グルタミン酸(Glu)、グリシン(Gly)、ロイシン(Leu)などの他のアミノ酸で置換した配列番号7～配列番号11で表される新規なノナペプチドを化学合成し、それらのオビオイド活性およびACE阻害活性を測定したところ、該配列番号7～配列番号11で表されるノナペプチドも、配列番号5および配列番号6で表されるノナペプチドと同様に、極めて高いオビオイド活性を有し且つACE阻害活性を有することを見いだした。そして、本発明者らによるかかる発見から、上記した配列番号5～配列番号11のノナペプチドを包括する配列番号1(式中Xaaはアミノ酸を示す)で表される新規なノナペプチド類が、一般に極めて高いオビオイド活性を有し且つACE阻害活性をも有し、極めて有用性に富むことが明らかになった。

40 【0015】同様に、本発明者らは、牛乳β-カゼインから得られた上記の配列番号3または配列番号4で表されるデカペプチドにおいて、そのC末端アミノ酸から2残基目のヒスチジン(His)またはプロリン(Pro)を、アラニン(Ala)、アルギニン(Arg)、グルタミン酸(Glu)、グリシン(Gly)、ロイシン(Leu)などの他のアミノ酸で置換した配列番号12～配列番号16で表される新規なデカペプチドを化学合成し、そのオビオイド活性およびACE阻害活性を測定したところ、それらの新規なデカペプチドも、配列番号3および配列番号4で表されるデカペプチドと同様に、オビオイド活性およびACE阻害活性

を有することを見いだした。そして、本発明者らによるかかる発見から、上記した配列番号3～配列番号4および配列番号12～配列番号16のデカペプチドを包括する配列番号2（式中 Xaa はアミノ酸を示す）で表される新規なデカペプチド類が、一般に高いオピオイド活性を有し且つACE阻害活性をも有し、有用性に富むことが明らかになった。

【0016】したがって、本発明は、配列番号1（式中 Xaa はアミノ酸を示す）で表されるペプチドおよびその塩である。更に、本発明は、配列番号2（式中 Xaa はアミノ酸を示す）で表されるペプチドおよびその塩である。

【0017】そして、本発明は、配列番号1（式中 Xaa はアミノ酸を示す）または配列番号2（式中 Xaa はアミノ酸を示す）で表されるペプチドおよびその塩の1種または2種以上を有効成分として含むオピオイド活性を有する剤、並びにアンジオテンシン変換酵素阻害活性を有する剤である。

【0018】配列番号1または配列番号2で表されるペプチドにおいて、C末端から2番目のアミノ酸；Xaa の種類は限定されず任意のアミノ酸とすることができるが、ヒスチジン(His)、プロリン(Pro)、アラニン(Ala)、アルギニン(Arg)、グルタミン酸(Glu)、グリシン(Gly)、ロイシン(Leu)などのアミノ酸が適当であり、その場合には、各ペプチドは配列番号3～配列番号16で表されるアミノ酸配列を有している。

【0019】更に、本発明は、(1) 乳蛋白を微生物起源の中性プロテアーゼまたはアルカリ性プロテアーゼを使用して加水分解し、得られる加水分解物からオピオイド活性を有するペプチドを回収することを特徴とするオピオイドペプチドの製造方法であり、この(1)の方法で製造されたオピオイドペプチドにはその化学構造が明らかなもの、および明らかでないオピオイドペプチドの両方が含まれる。

【0020】上記(1)の方法により得られるオピオイドペプチドには、配列番号3および配列番号4で表される新規なペプチドが含まれており、特に中性プロテアーゼとしてバチルス起源の中性プロテアーゼまたはアスペルギルス起源の中性プロテアーゼを使用し、またアルカリ性プロテアーゼとしてバチルス起源のアルカリ性プロテアーゼを使用した場合には、配列番号3および配列番号4で表されるペプチドを効率よく製造することができる。

【0021】また、本発明は、(2) 乳蛋白を微生物起源の中性プロテアーゼまたはアルカリ性プロテアーゼを使用して加水分解した後、アミノペプチダーゼを使用して更に加水分解し、得られる加水分解物からオピオイド活性を有するペプチドを回収することを特徴とするオピオイドペプチドの製造方法を包含する。

【0022】この(2)の方法により得られるオピオ

ドペプチドには、配列番号5および配列番号6で表される新規なペプチドが含まれており、特に中性プロテアーゼとしてバチルス起源の中性プロテアーゼまたはアスペルギルス起源の中性プロテアーゼを使用し、アルカリ性プロテアーゼとしてバチルス起源のアルカリ性プロテアーゼを使用し、またアミノペプチダーゼとしてロイシンアミノペプチダーゼを使用した場合には、配列番号5および配列番号6で表されるペプチドを効率よく製造することができる。

【0023】更に、本発明は、(3) 乳蛋白を微生物起源の中性プロテアーゼまたはアルカリ性プロテアーゼを使用して加水分解した後、更にアミノペプチダーゼとカルボキシペプチダーゼを同時または順序を問わず逐時に使用して加水分解し、得られる加水分解物からオピオイド活性を有するペプチドを回収することを特徴とするオピオイドペプチドの製造方法を包含する。ここで、「アミノペプチダーゼとカルボキシペプチダーゼを同時または順序を問わず逐時に使用して加水分解し」とは、中性プロテアーゼまたはアルカリ性プロテアーゼを使用して得た加水分解物を、アミノペプチダーゼとカルボキシペプチダーゼを同時に反応させて加水分解すること、またはアミノペプチダーゼおよびカルボキシペプチダーゼのうちのいずれか一方を使用して加水分解した後、残りのペプチダーゼで加水分解することを意味する。

【0024】この(3)の方法により得られるオピオイドペプチドのうちには、配列番号6で表される新規なペプチドおよび配列番号17で表される既知ペプチドが含まれており、特に中性プロテアーゼとしてバチルス起源の中性プロテアーゼまたはアスペルギルス起源の中性プロテアーゼを、アルカリ性プロテアーゼとしてバチルス起源のアルカリ性プロテアーゼを、アミノペプチダーゼとしてロイシンアミノペプチダーゼを、またカルボキシペプチダーゼとしてカルボキシペプチダーゼAを使用した場合には、配列番号6および配列番号17で表されるペプチドを効率よく製造することができる。

【0025】そして、本発明は、上記(1)～(3)のいずれかの方法により製造された配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6および配列番号17で表されるペプチドおよびその塩を包含する。

【0026】本発明では、上記した(1)～(3)のいずれかの方法によって乳蛋白を加水分解して配列番号3～配列番号6および配列番号17で表されるオピオイドペプチドを製造する方法を包含するが、配列番号3～配列番号17で表されるペプチドの製造法は、上記した(1)～(3)の方法に限定されず、化学合成、化学合成と酵素加水分解の併用、他の酵素加水分解法などによっても製造することができる。

【0027】例えば、化学合成やその他の上記(1)以外の方法によって配列番号3および配列番号4で表される各々のペプチドをつくり、それをロイシンアミノペ

チダーゼ等のアミノペプチダーゼを使用して加水分解した場合にも、配列番号5および配列番号6で表される各々のペプチドを製造することができる。

【0028】また、上記と同様に、化学合成やその他の上記(1)以外の方法によって配列番号3および配列番号4で表される各々のペプチドをつくり、それをロイシンアミノペプチダーゼ等のアミノペプチダーゼおよびカルボキシペプチダーゼA等のカルボキシペプチダーゼを使用して同時または順序を問わず逐時に使用して加水分解した場合にも、配列番号6および配列番号17で表される各々のペプチドを製造することができる。

【0029】更に、配列番号1または配列番号2で表されるペプチド類に包含される各々のペプチドを化学合成のみによって製造してもよい。

【0030】上記した本発明のペプチド類を乳蛋白の加水分解を利用して製造する場合は、乳蛋白質として種々の乳蛋白を使用することができるが、牛乳カゼインが好ましく、牛乳 β -カゼインが特に好ましい。牛乳 β -カゼインを使用する場合は、牛乳カゼインから精製された牛乳 β -カゼインのみからなるものを使用しても、または牛乳 α 、 κ カゼイン等の他のカゼインや蛋白質を含有するものを使用してもよい。

【0031】本発明のペプチドは、その発端は天然の乳蛋白の加水分解によって得られたものであり、その場合にはペプチドを構成しているアミノ酸はいずれもL-アミノ酸である。しかしながら、配列番号1または配列番号2で表されるペプチド類に包含される本発明の新規なペプチドを構成するアミノ酸は、L-アミノ酸に限定されず、配列番号1または配列番号2で表されるアミノ酸配列を有するペプチドであればどのような光学異性体であってもよい。例えば、アミノ酸の全部がL-アミノ酸のみからなっている、D-アミノ酸のみからなっている、各ペプチドを構成するアミノ酸のうちのいずれかがL-アミノ酸であって残りがD-アミノ酸であってもよい。

【0032】また、本発明における「オピオイド活性を有する剤」とは、鎮痛、麻酔、情動、呼吸、脈動、体温、消化管機能、摂食、免疫、インシュリンやソマトスタチン等のホルモンの分泌調節、電解質の吸収促進、心筋の収縮調節等に関与するいわゆるオピオイド活性として認識されている活性を有する剤をいう。更に、本発明における「ACE阻害活性を有する剤」とは血圧の上昇に関与するACEの作用を阻害して、血圧の上昇抑制、血圧降下等をもたらす得る剤をいう。

【0033】限定されるものではないが、牛乳 β -カゼインの加水分解により本発明のペプチドを調製する場合の例を以下に説明する。

【0034】〔配列番号3および配列番号4で表されるペプチドの製造方法〕上記したように、牛乳 β -カゼインを微生物起源の中性プロテアーゼまたはアルカリ性プ

ロテアーゼを使用して加水分解すると、配列番号3および配列番号4で表されるペプチドを含有するペプチド混合物を得ることができる。この場合に、牛乳 β -カゼインは、蒸留水または水道水に分散溶解させ、微生物由来の中性プロテアーゼまたはアルカリ性プロテアーゼで加水分解して、ペプチド混合物を調製する。

【0035】微生物起源の中性プロテアーゼとしては、バチルス起源の耐熱性プロテアーゼであるサーモライシン、アスベルギルス起源の金属プロテアーゼ、ストレプトマイセス起源の金属プロテアーゼ、リゾプス起源の金属プロテアーゼ等の金属プロテアーゼを挙げることができる。また、微生物起源のアルカリ性プロテアーゼとしては、バチルス起源のセリンプロテアーゼ等のアルカリ性プロテアーゼを挙げることができる。上記の中性プロテアーゼまたはアルカリ性プロテアーゼは、1種類のみを使用しても、またはプロテアーゼ同士がお互いに悪影響を及ぼさないかぎり複数種を併用することもできる。複数の中性プロテアーゼを使用する場合は、同時に作用させて加水分解を行っても、または1種類ずつ逐次に作用させて加水分解を行ってもよい。この場合、バチルス起源のサーモライシンを使用すると、目的物を高収率で得ることができ好ましい。

【0036】上記のプロテアーゼは、フリーの状態で使用しても、または固定化して使用してもよい。プロテアーゼの使用量は、乾燥した牛乳 β -カゼイン10g当たり約5,000~1,000,000unitsの割合で使用するのがよい。

【0037】プロテアーゼ処理は、各々の状況（例えばプロテアーゼの種類、プロテアーゼの使用形態等）に応じて最適のpH、温度、プロテアーゼ量、処理速度、処理時間等の条件を選択して行うのがよい。効率よく行える例としては、サーモライシン等の前記プロテアーゼを使用する場合は、一般的に温度約30~50℃で、pH約6~8で、0.75Mトリクロロ酢酸への溶解率が約40~80%になる程度で加水分解を行う方法を挙げることができる。

【0038】目的とする加水分解状態が達成された時点で加熱によりプロテアーゼを失活させ、精製した不溶性固形物を遠心分離等の適当な手段で分離除去し、ペプチド混合物を含有する上澄液を回収する。

【0039】次いで、このペプチド混合物を含有する上澄液から下記に記載する方法によって、高速液体クロマトグラフィー（例えば逆相カラムを使用した高速液体クロマトグラフィー）等により処理して配列番号3および配列番号4で表されるペプチドを単離する。

【0040】すなわち、上記の上澄液を高速液体クロマトグラフィー（使用カラムは例えばナカライテスク社製のODSカラムであるCosmosil 5C₁₈-ARに供して、0.1%トリフルオロ酢酸水溶液（A液）と0.1%トリフルオロ酢酸を含有するアセトニトリル溶液（B

液)で、B液の濃度が0%から40%まで直線的に増加する濃度勾配にて溶出し、アセトニトリル濃度が約32~33%の範囲のピーク画分(画分A)と約34~35%の範囲のピーク(画分B)を分取し、そのオピオイド活性を確認する。

【0041】上記で得たオピオイド活性画分(画分A、画分B)から溶媒を乾燥等により除去する。これらの乾燥物のアミノ酸配列を、例えばアブライドバイオシステム社製のプロテインシーケンサー(477-A型)等を使用して調べて、画分Aは配列番号3、そして画分Bは配列番号4で表されるペプチドであることを確認する。

【0042】[配列番号5および配列番号6で表されるペプチドの製造方法]上記したように、配列番号5および配列番号6で表されるペプチドは、配列番号3および配列番号4で表されるペプチドまたは該ペプチドを含有する混合物をアミノペプチダーゼを用いて加水分解することによって得られる。

【0043】アミノペプチダーゼは、ロイシニアミノペプチダーゼを使用すると目的物を高収率で得ることができ好ましい。その際に、アミノペプチダーゼは、フリーの状態で使用しても、または固定化して使用してもよい。アミノペプチダーゼの使用量は、配列番号3および配列番号4で表されるペプチドが純粋に単離されたものである場合またはペプチド混合物中に含有された形態になっている場合のいずれの場合も、乾燥した基質10g当たり約10,000~100,000unitsの割合で使用するのがよい。

【0044】アミノペプチダーゼ処理も、アミノペプチダーゼの種類に応じて反応条件を選択して行うのがよい。例えば、ロイシニアミノペプチダーゼを使用する場合は、液のpHを6~8に調整し、温度約30~50℃で約5~15時間加水分解を行うのがよい。目的とする加水分解が達成された時点で加熱によりアミノペプチダーゼを失活させ、反応液中に含まれる配列番号5および配列番号6で表されるペプチドを回収する。

【0045】基質として、純粋に単離された配列番号3および配列番号4で表されるペプチドを用いた場合は、このアミノペプチダーゼ処理により、配列番号5および配列番号6で表されるペプチドの各々がほぼ100%の収率で得られる。

【0046】基質として、配列番号3および配列番号4で表されるペプチドを含有する牛乳β-カゼインの酵素分解物を用いた場合は、上記の逆相系カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーにより、配列番号5および配列番号6のペプチドを単離する。条件は、配列番号3および配列番号4で表されるペプチドに使用したのと同様にして行い、アセトニトリル濃度が約29~30%の範囲のピーク画分(画分C)と約31~32%の範囲のピーク(画分D)を分取し、そのオピオイド活性を確認

し、上記と同様にしてアミノ酸配列を調べ、画分Cは配列番号5のペプチドであり、画分Dは配列番号6のペプチドであることを確認する。

【0047】[配列番号17で表される既知のペプチドであるβ-casomorphin 7の製造方法]上記したように、配列番号17で表される既知のペプチドであるβ-casomorphin 7は、配列番号5で表されるペプチドまたは該ペプチドを含有する混合物をカルボキシペプチダーゼを用いて加水分解することによって得られる。

【0048】カルボキシペプチダーゼは、カルボキシペプチダーゼAを使用すると目的物を高収率で得ることができ好ましい。その際に、カルボキシペプチダーゼは、フリーの状態で使用しても、または固定化して使用してもよい。カルボキシペプチダーゼの使用量は、配列番号5で表されるペプチドが純粋に単離されたものであっても、またはペプチド混合物中に含有された形態になっているものであっても、いずれの場合も、乾燥した基質10g当たり約10,000~500,000unitsの割合で使用するのがよい。

【0049】カルボキシペプチダーゼ処理も、カルボキシペプチダーゼの種類に応じて反応条件を選択して行うのがよい。例えば、カルボキシペプチダーゼAを使用する場合は、液のpHを6~8に調整し、温度約30~50℃で約5~15時間加水分解を行うのがよい。目的とする加水分解が達成された時点で加熱によりカルボキシペプチダーゼを失活させ、反応液中に含まれる配列番号17で表される既知のペプチドであるβ-casomorphin 7を回収する。

【0050】基質として、純粋に単離された配列番号5で表されるペプチドを用いた場合は、このカルボキシペプチダーゼ処理により、配列番号17で表される既知のペプチドであるβ-casomorphin 7がほぼ100%の収率で得られる。

【0051】基質として、配列番号5で表されるペプチドを含有する牛乳β-カゼインの酵素分解物を用いた場合は、上記の逆相系カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーにより、配列番号17で表される既知のペプチドであるβ-casomorphin 7を単離する。条件は、配列番号3および配列番号4で表されるペプチドに使用したのと同様にして行い、アセトニトリル濃度が約34~35%の範囲のピーク画分(画分E)を分取し、この画分のオピオイド活性を確認し、上記と同様にしてアミノ酸配列を調べ、画分Eは配列番号17のペプチドであるβ-casomorphin 7であることを確認する。

【0052】また、配列番号1または配列番号2で表される本発明の新規なペプチドを化学合成により製造する方法について、配列番号3で表されるペプチドを例にとって説明すると、例えば次の方法を採用することができる。

50 本発明ペプチドの化学合成法

米国バイオサーチ社のSAM TWO 型自動ペプチド合成装置を使用して同装置の標準プロトコールにしたがって合成を行う。すなわち、Boc (ブトキシカルボニル)-Asn-樹脂を45%トリフルオロ酢酸を含むデブロック液で処理した後に、Boc-Hisをジソプロピルカルボジイミドの存在下でカップリングさせて、Boc-His-Asn樹脂を得る。以下、上記と同様にデブロッキングとカップリングを繰り返して、Boc-Val-Tyr (Cl₂-Bzl)-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-His-Asn樹脂を得る。このペプチド樹脂を10%アニソールを含むフッ化水素中に投入して0℃で2時間攪拌する。フッ化水素を留去した後、エーテルで残留物を洗浄し、30%酢酸でペプチドを抽出する。抽出して得た粗ペプチドをODSカラムによる高速液体クロマトグラフィーを使用して精製することにより、配列番号3で表されるペプチドを得る。

【0053】また、配列番号1または配列番号2に包含される他のペプチドについても、上記と同様の操作によって合成および精製を行うことにより、目的とするペプチドを得ることができる。

【0054】そして、上記のようにして製造された配列番号1または配列番号2で表されるペプチドおよびその塩、並びにその化学構造は未だ解明されていないが乳蛋白、特に牛乳β-カゼインを微生物起源の中性プロテアーゼまたはアルカリ性プロテアーゼで加水分解して得られるオピオイドペプチドおよびその塩を有効成分として含有する本発明のオピオイド活性を有する剤は、鎮痛、麻酔、情動、呼吸、脈動、体温、消化管機能、摂食、免疫、インシュリンやソマトスタチン等のホルモンの分泌調節、電解質の吸収促進、心筋の収縮調節等に関与している可能性があり、例えば鎮痛麻酔剤、催眠剤、消化管ホルモン分泌促進剤、電解質吸収促進剤、腸管ぜん動抑制による下痢改善剤等として、人間や種々の動物に投与することができる。

【0055】更に、配列番号1または配列番号2で表されるペプチドおよびその塩を有効成分として含有する本発明のACE阻害活性を有する剤は、ACE阻害活性により、血圧の上昇に関与するACEの作用を阻害して、血圧の上昇抑制、血圧降下等に関与し、例えば血圧の上昇抑制剤、血圧降下剤等として人間や種々の動物に投与することができる。

【0056】そして、上記のオピオイドペプチド活性を有する剤およびACE阻害活性を有する剤においては、上記のペプチドおよびその塩を、1種類のみ使用してもまたは2種以上のペプチドを含む混合物の形態で使用してもよい。それらの剤の好適な投与量は、投与される人間や動物の年齢、体重、性別、症状、動物の種類等の種々の条件によって異なる。

【0057】上記の剤はいずれも経口または非経口によって投与可能であり、更に単独で投与しても、また製薬工業において通常使用されている固体担体や液状担体と

一緒に投与してもよく、或は他の薬剤と混合または組合わせて使用することができる。また投与形態は、錠剤、丸剤、顆粒剤、カプセル、散剤、水溶液、注射剤等の任意の形態が可能である。更に、本発明のオピオイド活性を有する剤およびACE阻害活性を有する剤は、食品や飼料中に添加して、またはそれらと一緒に投与することもでき、その場合に乳蛋白から得られたペプチドが安全性が高く望ましい。以下に、本発明を例を挙げて具体的に説明するが本発明はそれらによって限定されない。

【0058】

【実施例】

実施例 1

【牛乳β-カゼインの加水分解による配列番号3および配列番号4で表されるペプチドの調製】牛乳β-カゼイン100mgを10mlの蒸留水に分散溶解させ、サモライシン (ペプチド研究所製) 0.5mg (約4,000 units) を加えて37℃で5時間インキュベートした。反応終了後、90℃で20分間加熱して酵素を失活させ、6,000Gで20分間遠心分離して不溶物を除き、得られた上澄液を凍結乾燥して加水分解物約90mgを得た。

【0059】上記で得た加水分解物10mgをナカライテスク社製ODSカラムであるCosmosil 5C₁₈-AR (内径20mm、長さ250mm) を使用した逆相クロマトグラフィーに供した。次いで0.1%トリフルオロ酢酸水溶液 (A液) と0.1%トリフルオロ酢酸を含有するアセトニトリル溶液 (B液) を使用して、B液の濃度が0%から40%まで直線的に増加する濃度勾配にて10ml/分の流速で溶出させた。その時の波長220nmにおけるフローチャートを図1に示す。図1に示したフローチャートにおける各画分を分取してそのオピオイド活性を測定したところ、アセトニトリルの濃度が約32~33%の範囲で溶出してくる画分 (画分A) と約34~35%の範囲で溶出してくる画分 (画分B) にオピオイド活性が認められた。そこで、このオピオイド活性画分 (画分A、画分B) を回収して、濃縮乾燥した。なお、図1において、左側縦軸は溶離してきた液のAbs. 220を、右側縦軸は溶離液中のアセトニトリル濃度 (%) を示す。

【0060】上記で得た乾燥物をアプライドバイオシステム社製のプロテインシーケンサー477-A型を使用してそのアミノ酸配列を調べたところ、画分Aの乾燥物は、構成アミノ酸のすべてがL体であり、N末端から順次Val-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-His-Asnの配列からなる配列番号3で表されるペプチドであることが確認された。また、画分Bの乾燥物は、構成アミノ酸のすべてがL体であり、N末端から順次Val-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Asnの配列からなる配列番号4で表されるペプチドであることが確認された。

【0061】配列番号3および配列番号4で表される各

ペプチドの原料牛乳β-カゼインからの収率(%)を、その分子量とAbs.₂₈₀における分子吸光係数から求めたところ、各々約1%および約1.5%であり、極めて高い収率であった。

【0062】また、シリカゲルプレートによる薄層クロマトグラフィーでRf値を求めたところ、ブタノール：酢酸：ピリジン：水=15：3：10：12の展開溶媒を使用した場合のRf値は、配列番号3で表されるペプチドが0.49であり、配列番号4で表されるペプチドが0.57であった。

【0063】実施例 2

【配列番号3および配列番号4で表されるペプチドからの配列番号5および配列番号6で表されるペプチドの調製】実施例1と同様の処理により、牛乳β-カゼインのサーモライシン加水分解物80mgから、配列番号3で表されるペプチド約800μg、配列番号4で表されるペプチド約1200μgを純粋に単離した(各ペプチド量はその分子量とAbs.₂₈₀における分子吸光係数から求めた)。

【0064】上記で単離されたペプチドを1mlの蒸留水に溶解させ、1N NaOHでpHを7に調整した後、ロイシンアミノペプチダーゼ(シグマ社製)を各ペプチドに対して、その重量に基づいて約5%(約20units)添加し、36℃で約16時間インキュベートした。反応終了後、90℃で20分間加熱して酵素を失活させた後、実施例1で用いたのと同様の高速液体クロマトグラフィーに供し、反応液中に含まれるペプチドを精製した。配列番号3のペプチドの加水分解物からは、アセトニトリルの濃度が約29~30%の範囲で溶出してくる画分にオピオイド活性が認められ、また配列番号4のペプチドの加水分解からはアセトニトリル濃度が約31~32%の範囲で溶出してくる画分にオピオイド活性が認められた。そこで、これらのオピオイド活性画分を回収し、濃縮乾燥した。

【0065】上記で得た乾燥物を実施例1で用いたプロテインシーケンサーを使用してそのアミノ酸配列を調べたところ、配列番号3で表されるペプチドの加水分解物から得られた乾燥物は、その構成アミノ酸のすべてがL体であり、N末端から順次Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-His-Asnの配列からなる配列番号5で表されるペプチドであることが確認された。また、配列番号4で表されるペプチドの加水分解物から得られた乾燥物は、構成アミノ酸のすべてがL体であり、N末端から順次Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Asnの配列からなる配列番号6で表されるペプチドであることが確認された。

【0066】配列番号5および配列番号6で表される各ペプチドの、配列番号3および配列番号4で表されるペプチドからの収率(%)を、その分子量とAbs.₂₈₀における分子吸光係数から求めたところ、いずれもほぼ100%であった。

【0067】また、実施例1と同様にシリカゲルプレートによる薄層クロマトグラフィーでRf値を求めたところ、Rf値は配列番号5で表されるペプチドが0.46であり、配列番号6で表されるペプチドが0.59であった。

【0068】実施例 3

【配列番号5で表されるペプチドからの配列番号17で表される既知のペプチドであるβ-casomorphin7の調製】実施例2で得られた配列番号5で表されるペプチド500μgを1mlの蒸留水に溶解させ、1N NaOHでpHを7に調整した後、カルボキシペプチダーゼA(シグマ社製)をペプチドに対して、その重量に基づいて約5%(約12.5units)添加し、36℃で約16時間インキュベートした。反応終了後、90℃で20分間加熱して酵素を失活させた後、反応液を実施例1で用いたのと同様の高速液体クロマトグラフィーに供し、反応液中に含まれるペプチドを精製した。配列番号5のペプチドの加水分解物からは、アセトニトリルの濃度が約34~35%の範囲で溶出してくる画分にオピオイド活性が認められた。そこで、このオピオイド活性画分を回収し、濃縮乾燥した。

【0069】上記で得た乾燥物を実施例1で用いたプロテインシーケンサーを使用してそのアミノ酸配列を調べたところ、その構成アミノ酸のすべてがL体であり、N末端から順次Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ileの配列からなる配列番号17で表されるペプチドであるβ-casomorphin7であることが確認された。配列番号17で表される既知のペプチドであるβ-casomorphin7の、配列番号5で表されるペプチドからの収率(%)を、その分子量とAbs.₂₈₀における分子吸光係数から求めたところ、ほぼ100%であった。また、実施例1と同様にシリカゲルプレートによる薄層クロマトグラフィーでRf値を求めたところ、Rf値は0.72であった。

【0070】実施例 4

【牛乳β-カゼインの加水分解による配列番号5および配列番号6で表されるペプチドの調製】牛乳β-カゼイン100mgを10mlの蒸留水に分散溶解させ、サーモライシン(ペプチド研究所製)0.5mg(約4,000units)を加えて37℃で5時間インキュベートした。反応終了後、更にロイシンアミノペプチダーゼ(シグマ社製)を5mg(約1,000units)添加し、36℃で約16時間インキュベートした。反応終了後、90℃で20分間加熱して酵素を失活させ、6000Gで20分間遠心分離して不溶物を除き、得られた上澄液を凍結乾燥して加水分解物約80mgを得た。

【0071】上記で得た加水分解物10mgを実施例1で用いたのと同様の高速液体クロマトグラフィーに供し、溶出させた。その時の波長220nmにおけるフローチャートを図2に示す。図2に示したフローチャートにおける各画分を分取してそのオピオイド活性を測定し

たところ、アセトニトリルの濃度が約29~30%の範囲で溶出してくる画分(画分C)と約31~32%の範囲で溶出してくる画分(画分D)にオピオイド活性が認められた。そこで、このオピオイド活性画分(画分C、画分D)を回収して、濃縮乾燥した。なお、図2において、左側縦軸は溶離してきた液のAbs. 220を、右側縦軸は溶離液中のアセトニトリル濃度(%)を示す。

【0072】上記で得た乾燥物を実施例1で用いたプロテインシーケンサーを使用してそのアミノ酸配列を調べたところ、画分Cから得られた乾燥物は、その構成アミノ酸のすべてがL体であり、Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-His-Asnの配列からなる配列番号5で表されるペプチドであることが確認された。また、画分Dから得られた乾燥物は、構成アミノ酸の全てがL体であり、Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Asnの配列からなる配列番号6で表されるペプチドであることが確認された。

【0073】配列番号5および配列番号6で表される各ペプチドの、原料牛乳β-カゼインからの収率(%)を、その分子量とAbs. 280における分子吸光係数から求めたところ、各々、約0.9%および約1.4%であることが確認された。

【0074】また、実施例1と同様にシリカゲルプレートによる薄層クロマトグラフィーでRf値を求めたところ、Rf値は配列番号5で表されるペプチドが0.46であり、配列番号6で表されるペプチドが0.59であった。

【0075】実施例 5

【牛乳β-カゼインの加水分解による配列番号17で表される既知のペプチドであるβ-casomorphin 7の調製】牛乳β-カゼイン100mgを10mlの蒸留水に分散溶解させ、サーモライシン(ペプチド研究所製)0.5mg(約4,000units)を加えて37℃で5時間インキュベートした。反応終了後、更にロイシンアミノペプチダーゼ(シグマ社製)5mg(約1,000units)とカルボキシペプチダーゼA 5mg(約2,500units)を添加し、36℃で約16時間インキュベートした。反応終了後、90℃で20分間加熱して酵素を失活させ、6000Gで20分間遠心分離して不溶物を除き、得られた上澄液を凍結乾燥して加水分解物約80mgを得た。

【0076】上記で得た加水分解物10mgを実施例1で用いたのと同様の高速液体クロマトグラフィーに供し、溶出させた。その時の波長220nmにおけるフローチャートを図3に示す。図3に示したフローチャートにおける各画分を分取してそのオピオイド活性を測定したところ、アセトニトリルの濃度が約31~32%の範囲で溶出してくる画分(画分E)と約34~35%の範囲で溶出してくる画分(画分F)にオピオイド活性が認められた。そこで、これらのオピオイド活性画分(画分E、画分F)を回収して、濃縮乾燥した。なお、図3に

において、左側縦軸は溶離してきた液のAbs. 220を、右側縦軸は溶離液中のアセトニトリル濃度(%)を示す。

【0077】上記で得た乾燥物を実施例1で用いたプロテインシーケンサーを使用してそのアミノ酸配列を調べたところ、画分Eから得られた乾燥物は、構成アミノ酸の全てがL体であり、Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Asnの配列からなる配列番号6で表されるペプチドであることが確認された。また、画分Fから得られた乾燥物は、その構成アミノ酸のすべてがL体であり、Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ileの配列からなる配列番号17で表されるペプチドであることが確認された。

【0078】また、配列番号6で表されるペプチドおよび配列番号17で表される既知のペプチドであるβ-casomorphin 7の、原料牛乳β-カゼインに対する収率(%)を、その分子量とAbs. 280における分子吸光係数から求めたところ、各々約1.4%および約0.7%であることが確認された。

【0079】また、実施例1と同様にシリカゲルプレートによる薄層クロマトグラフィーでRf値を求めたところ、実施例2と同様に配列番号6で表されるペプチドが0.59であり、実施例3と同様に配列番号17で表される既知のペプチドであるβ-casomorphin 7が0.72であった。

【0080】実施例 6

【配列番号3~配列番号16で表されるペプチドの化学合成】配列番号3で表されるペプチドの合成は以下の方法で行った。市販のBoc(ブトキシカルボニル)-Asn-樹脂(置換率0.5meq/g)0.2gと45%トリフルオロ酢酸および2.5%アニソールを含む塩化メチレン20mlをバイオサーチ社のペプチド合成装置SAM TWOの反応槽の中で室温で25分間反応させてBoc基を除去した。次にBoc基の除去されたAsn-樹脂を塩化メチレンで洗浄し、次いで10%のジイソプロピルエチルアミンを含む塩化メチレンにより中和した後、更に塩化メチレンで洗浄した。この樹脂に0.4M Boc-Hisのジメチルホルムアミド溶液5ml、0.4Mジイソプロピルカルボジミドの塩化メチレン溶液5mlを混合して反応槽に入れて室温で2時間攪拌下に反応させた。

【0081】上記で得られた樹脂を、順にジメチルホルムアミド、塩化メチレン、ジイソプロピルエチルアミンを10%含有する塩化メチレン、塩化メチレンおよび塩化メチレン/ジメチルホルムアミド混合液で洗浄してBoc-His-Asn-樹脂を得た。引き続き上記と同様にしてBoc基の除去、Boc-アミノ酸のカップリングを繰り返してBoc-Val-Tyr(Cl₂-Bzl)-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-His-Asn樹脂からなる生成物を得た。

【0082】この樹脂を10%のアニソールを含有するフッ化水素20mlに入れて0℃で2時間攪拌してペプチドを樹脂から遊離させた。その後、フッ化水素を減圧

留去し、残留物を30%酢酸で抽出し、それを凍結乾燥して粗ペプチド100mgを得た。これをナカライテスク株式会社製のODSカラムであるCosmosil 5 C₁₈-ARを用いた逆相クロマトグラフィーにより精製して最終生成物30mgを得た。そのアミノ酸組成(モル比)は、Val:Tyr:Pro:Phe:Gly:Ile:His:Asn=1:1:3:1:1:1:1:1であった。更に実施例1で使用したプロテインシーケンサーにより分析したところ、配列番号3で表されるペプチドであることが確認された。また該生成物の薄層クロマトグラフィーのR_f値は、実施例1の生成物と同様に0.49であった。 *

*【0083】また、配列番号4~配列番号16で表されるペプチドの場合も、配列番号3で表されるペプチドの場合と同様にして、市販のBoc-Asn-樹脂(置換率0.5meq/g)0.2gから目的とする最終生成物(各ペプチド)を製造した。その際の最終生成物(各ペプチド)の収量、アミノ酸組成(モル比)および該最終生成物の薄層クロマトグラフィーのR_f値は、下記の表1に示すとおりであった。

【0084】

【表1】

配列 番号	収量 (mg)	アミノ酸組成(モル比)	R _f 値
3	30	Val:Tyr:Pro:Phe:Gly:Ile:His:Asn=1:1:3:1:1:1:1:1	0.49
4	40	Val:Tyr:Pro:Phe:Gly:Ile:Asn=1:1:4:1:1:1:1	0.57
5	28	Tyr:Pro:Phe:Gly:Ile:His:Asn=1:3:1:1:1:1:1	0.46
6	35	Tyr:Pro:Phe:Gly:Ile:Asn=1:4:1:1:1:1:1	0.59
7	30	Tyr:Pro:Phe:Gly:Ile:Ala:Asn=1:3:1:1:1:1:1	0.59
8	22	Tyr:Pro:Phe:Gly:Ile:Arg:Asn=1:3:1:1:1:1:1	0.76
9	20	Tyr:Pro:Phe:Gly:Ile:Glu:Asn=1:3:1:1:1:1:1	0.54
10	18	Tyr:Pro:Phe:Gly:Ile:Asn=1:3:1:2:1:1:1	0.62
11	20	Tyr:Pro:Phe:Gly:Ile:Leu:Asn=1:3:1:1:1:1:1	0.77
12	35	Val:Tyr:Pro:Phe:Gly:Ile:Ala:Asn=1:1:3:1:1:1:1:1	0.56
13	25	Val:Tyr:Pro:Phe:Gly:Ile:Arg:Asn=1:1:3:1:1:1:1:1	0.65
14	25	Val:Tyr:Pro:Phe:Gly:Ile:Glu:Asn=1:1:3:1:1:1:1:1	0.46
15	27	Val:Tyr:Pro:Phe:Gly:Ile:Asn=1:1:3:1:2:1:1:1	0.53
16	22	Val:Tyr:Pro:Phe:Gly:Ile:Leu:Asn=1:1:3:1:1:1:1:1	0.66

【0085】上記の実施例1~6における各画分のオピオイド活性および配列番号3~配列番号16で表される新規なペプチド、並びに配列番号17で表される既知のペプチドであるβ-casomorphin 7、配列番号20で表される既知のペプチドであるpro-β-casomorphin 7のオピオイド活性は、いずれも次のようにして測定した。

【0086】《オピオイド活性の測定法》体重200~250gのモルモットより摘出した回腸縦走筋をアイソトニックトランジェンサー(日本光電工業株式会社製:TB 612-T)に接続して0.5gの張力をかける。36℃に保温した2ml容量のマグナス管内に、Krebs等張液(NaCl 118mM、KCl 4.75mM、CaCl₂ 2.54mM、MgSO₄ 1.2mM、NaHCO₃ 25mM、KH₂PO₄ 1.19mM、グルコース11mM)を満たしたものの中に回腸縦走筋を浸して、ポンベから通気(O₂ 95%:CO₂ 5%)を行った。このようにして約2時間安定化させた後、30Vで0.5msecの電気刺激を与え、回腸縦走筋を電気収縮させた。電気収縮が安定した後、アミノペプチダーゼ阻害剤等を含むインヒビター50μlを加え、実施例1~6における各画分および配列番号

3~配列番号17で表されるペプチドの各々を添加し、回腸縦走筋の電気収縮の変化をレコーダーで記録した。オピオイド活性は画分およびペプチドの各々の添加後の電気収縮の抑制と10⁻⁴Mナロキソン20μl添加による抑制の解除によって判定した。そして回腸縦走筋の電気収縮を50%抑制する濃度(IC₅₀)を測定した。

【0087】その結果、上記実施例で得られた配列番号3~配列番号16で表される新規なペプチド、配列番号17で表される既知のペプチドであるβ-casomorphin 7のオピオイド活性のIC₅₀は下記の表2に示すとおりであった。参考のため配列番号20で表される既知のペプチドであるpro-β-casomorphin 7のオピオイド活性を上記と同様にして測定したときのIC₅₀を下記の表2に併記する。

【0088】更に、配列番号3~配列番号16で表される新規なペプチドのACE阻害活性、および配列番号17で表される既知のペプチドであるβ-casomorphin 7のACE阻害活性、並びに配列番号20で表される既知のペプチドであるpro-β-casomorphin 7のACE阻害活性は、いずれも下記のようにして測定した。

【0089】《ACE測定活性の測定法》ACE阻害活性の測定は、Biochemical Pharmacology 20;1937(1971)に記載のCheung and Cushman 法に準じて下記の方法により行った。

酵素基質：Bz(ベンジル)-Gly-His-Leu 86mgを蒸留水8mlとリン酸緩衝液8mlに溶解した溶液

酵素溶液：ウサギの肺のアセトンパウダー(シグマ社製)1gを50nMリン酸緩衝液10ml中で粉碎した後、遠心分離した上澄液

上記の酵素基質100 μ l、酵素溶液12 μ lおよび配列番号3～配列番号17で表されるペプチドの所定量を混合し、蒸留水を加えて全体の液量を250 μ lとした後、酢酸エチル1.5mlを加えて15秒間攪拌し、それを遠心分離した。酢酸エチル層から1mlを分取して酢酸エチルを留去し、残留物に蒸留水1mlを加えて溶解させた。溶解液の228nmにおける紫外吸収値(O*

*D₂₂₈)を測定した。

【0090】ACE活性阻害率は、ペプチド(阻害剤)なしで上記と同様に反応させた時のOD₂₂₈を100%とし、かつ反応開始前(反応時間0分の時)のOD₂₂₈を0%とした時に、ACE活性阻害率が50%になるときの阻害剤の濃度をIC₅₀として求めた。その結果、上記実施例で得られた配列番号3～配列番号16で表される新規なペプチド、配列番号17で表される既知のペプチドである β -casomorphin 7のACE阻害活性のIC₅₀は下記の表2に示すとおりであった。参考のため配列番号20で表される既知のペプチドであるpro- β -casomorphin 7のACE阻害活性を上記と同様にして測定した時のIC₅₀を表2に併記する。

【0091】

【表2】

ペプチドの種類	オピオイド活性	ACE阻害活性
	IC ₅₀	IC ₅₀
<u>配列番号1に含まれるノナペプチド</u>		
配列番号5のペプチド	14	55
配列番号6のペプチド	11.4	450
配列番号7のペプチド	14	100
配列番号8のペプチド	24	115
配列番号9のペプチド	20	34
配列番号10のペプチド	16	37
配列番号11のペプチド	14	40
<u>配列番号2に含まれるデカペプチド</u>		
配列番号3のペプチド	141	170
配列番号4のペプチド	270	250
配列番号12のペプチド	150	200
配列番号13のペプチド	150	200
配列番号14のペプチド	170	150
配列番号15のペプチド	120	200
配列番号16のペプチド	140	250
<u>配列番号17の既知ペプチド</u>	14	500
(β -casomorphin 7)		
<u>配列番号20の既知ペプチド</u>	240	330
(pro- β -casomorphin 7)		

【0092】上記表2の結果から、配列番号3～配列番号16で表される本発明の新規なペプチドがオピオイド活性を有し、そのうちでも配列番号1で表されるペプチドに包含される配列番号5～配列番号11で表されるノナペプチドが高いオピオイド活性を有することがわかる。また、配列番号3～配列番号16で表される本発明の新規なペプチドは、配列番号17で表される既知のペプチドに比べて少ない量でACEの活性を阻害し得ることがわかる。

【0093】

【発明の効果】本発明のペプチドおよびその塩はオピオイド活性を有しているので、該ペプチドおよびその塩を有効成分とする剤は極めて少量の投与で、鎮痛、麻酔、情動、呼吸、脈動、体温、消化管機能、摂食、免疫、インシュリンやソマトスタチン等のホルモンの分泌調節、電解質の吸収促進、心筋の収縮調節機能を示す可能性があるため、鎮痛麻酔剤、催眠剤、消化管ホルモン分泌促進剤、電解質の吸収促進剤、胃腸輸送筋収縮による下痢改善剤としての利用が期待できる。配列番号2で表されるペプチド類に包含されるペプチドは、配列番号1で表

されるペプチド類に包含されるペプチドに比べてオピオイド活性が低い、生体内で加水分解されて配列番号1で表されるペプチドになり高活性化される可能性があり、プロドラッグとして使用できる可能性が大きい。

【0094】更に、配列番号1または配列番号2で表される本発明のペプチドおよびその塩は、ACE阻害活性を有しており、極めて少量の投与で、血圧の上昇に関与するACEの作用を阻害し、血圧の上昇抑制、血圧降下機能を示し得るので、血圧の上昇抑制剤および血圧降下剤としての利用も期待できる。

【0095】上記のオピオイド活性剤およびACE活性阻害剤としてしようする場合に、本発明のペプチドおよびその塩は、水溶性の白色粉末であるため、そのまままたは水等に溶解させて経口および非経口のいずれの方法によっても極めて簡単に投与することができる。

【0096】また、配列番号1または配列番号2で表される本発明の新規なペプチドおよびその塩は、9または10個のアミノ酸が配列しただけの極めて簡単な構造を有する低分子量化合物であるため、化学合成によって簡単に製造することができる。更に、配列番号3～配列番号6および配列番号17で表されるペプチドは、牛乳β-カゼイン等の乳蛋白を加水分解することによって、高収率で確実に得ることができる。

【0097】

【配列表】

【0098】配列番号：1

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Tyr Pro Phe Pro Gly Pro Ile Xaa Asn

1 5

【0099】配列番号：2

配列の長さ：10

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Val Tyr Pro Phe Pro Gly Pro Ile Xaa Asn

1 5 10

【0100】配列番号：3

配列の長さ：10

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Val Tyr Pro Phe Pro Gly Pro Ile His Asn

1 5 10

【0101】配列番号：4

配列の長さ：10

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Val Tyr Pro Phe Pro Gly Pro Ile Pro Asn

1 5 10

【0102】配列番号：5

配列の長さ：9

10 配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Tyr Pro Phe Pro Gly Pro Ile His Asn

1 5

【0103】配列番号：6

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

20 配列の種類：ペプチド

配列

Tyr Pro Phe Pro Gly Pro Ile Pro Asn

1 5

【0104】配列番号：7

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

30 Tyr Pro Phe Pro Gly Pro Ile Ala Asn

1 5

【0105】配列番号：8

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Tyr Pro Phe Pro Gly Pro Ile Arg Asn

1 5

40 【0106】配列番号：9

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Tyr Pro Phe Pro Gly Pro Ile Glu Asn

1 5

【0107】配列番号：10

配列の長さ：9

50 配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Tyr Pro Phe Pro Gly Pro Ile Gly Asn

1

5

【0108】配列番号：11

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Tyr Pro Phe Pro Gly Pro Ile Leu Asn

1

5

【0109】配列番号：12

配列の長さ：10

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Val Tyr Pro Phe Pro Gly Pro Ile Ala Asn

1

5

10

【0110】配列番号：13

配列の長さ：10

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Val Tyr Pro Phe Pro Gly Pro Ile Arg Asn

1

5

10

【0111】配列番号：14

配列の長さ：10

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Val Tyr Pro Phe Pro Gly Pro Ile Glu Asn

1

5

10

【0112】配列番号：15

配列の長さ：10

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Val Tyr Pro Phe Pro Gly Pro Ile Gly Asn

1

5

10

【0113】配列番号：16

配列の長さ：10

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Val Tyr Pro Phe Pro Gly Pro Ile Leu Asn

1

5

10

【0114】配列番号：17

配列の長さ：7

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

10

Tyr Pro Phe Pro Gly Pro Ile

1

5

【0115】配列番号：18

配列の長さ：5

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Tyr Pro Phe Pro Gly

1

5

20 【0116】配列番号：19

配列の長さ：4

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Tyr Pro Phe Pro

1

【0117】配列番号：20

配列の長さ：8

30 配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Val Tyr Pro Phe Pro Gly Pro Ile

1

5

【図面の簡単な説明】

【図1】牛乳β-カゼインをサーモライシンで加水分解して得られたペプチド混合物を高速液体クロマトグラフィーに通し、その吸着成分を直線濃度勾配を有する特定の溶離液により溶離した時の該成分の吸光度を測定したフローチャートである。

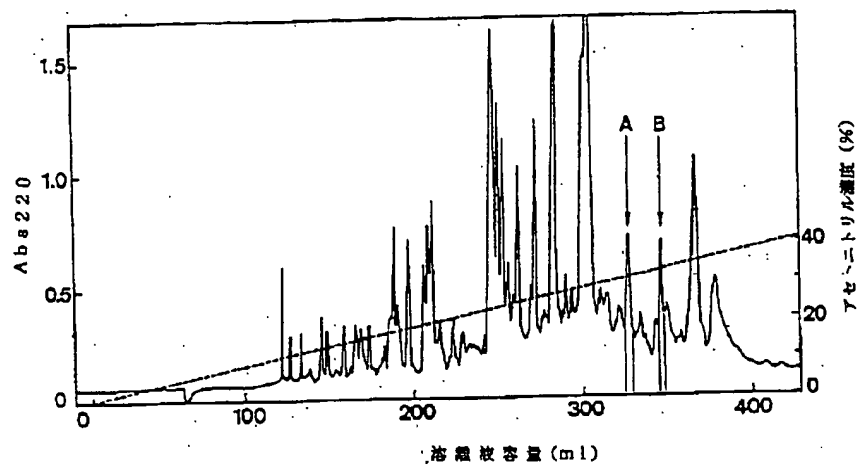
【図2】牛乳β-カゼインをサーモライシンとロイシンアミノペプチダーゼで加水分解して得られたペプチド混合物を高速液体クロマトグラフィーに通し、その吸着成分を直線濃度勾配を有する特定の溶離液により溶離した時の該成分の吸光度を測定したフローチャートである。

【図3】牛乳β-カゼインをサーモライシン、ロイシンアミノペプチダーゼおよびカルボキシペプチダーゼAで加水分解して得られたペプチド混合物を高速液体クロマトグラフィーに通し、その吸着成分を直線濃度勾配を有

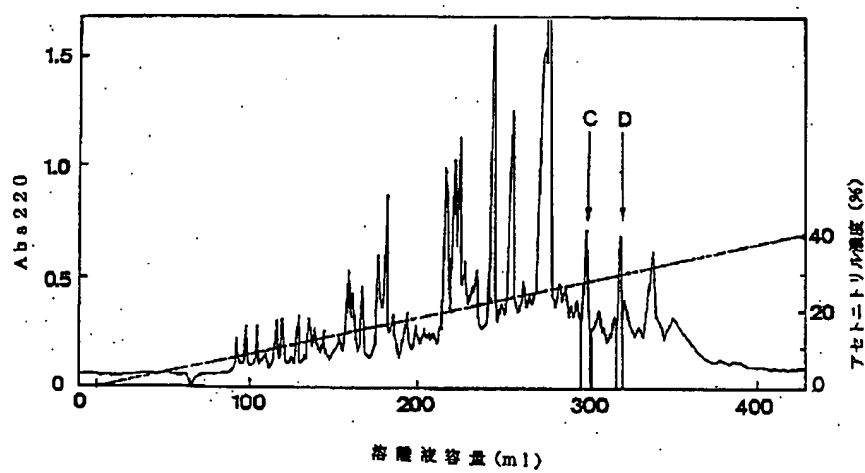
する特定の溶離液により溶離した時の該成分の吸光度を

測定したフローチャートである。

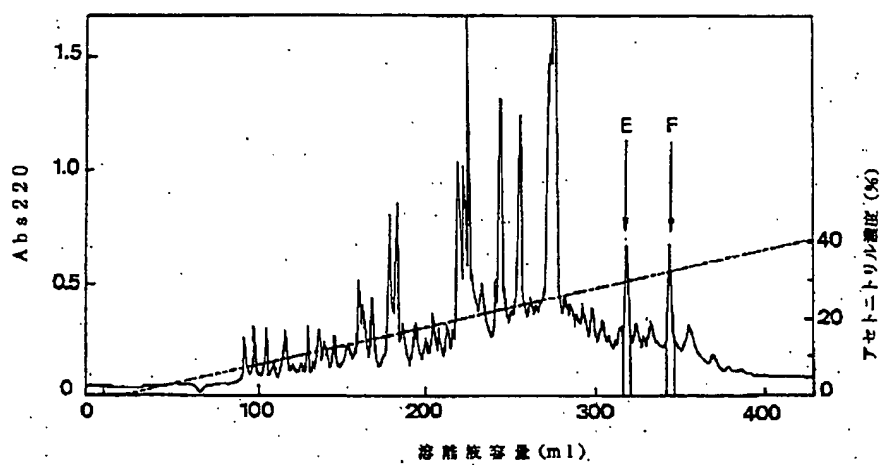
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁵

A 6 1 K 37/64

C 0 7 K 99:00

識別記号

A E Q

庁内整理番号

8314-4C

F I

技術表示箇所